

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09075085 A**(43) Date of publication of application: **25.03.97**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
C12N 9/64
// A61K 38/00
A61K 38/00
(C12N 15/09 , C12R 1:91), (C12N 1/21
, C12R 1:19), (C12N 9/64 , C12R 1:19)

(21) Application number: **07235052**(22) Date of filing: **13.09.95**(71) Applicant: **SAGAMI CHEM RES CENTER**

(72) Inventor: **KATO MASASHI**
SAEKI MIHORO
SEKINE SHINGO
TANAKA KEIJI

(54) HUMAN 26S PROTEASOME-CONSTITUTING
COMPONENT PROTEIN AND DNA CODING THE
SAME

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new protein having a specific amino acid sequence, constituting a human intracellular protease, that is human 26S proteasome, and useful for clarifying the function of the proteasome, for treating, diagnosing, etc., various kinds of diseases such as Alzheimer disease.

SOLUTION: This new protein is a component constituting the human 26S proteasome containing the amino acid sequence of the formula. The new protein has an important role in the intracellular protein decomposition system, and is useful for the clarification of the function of the human 26S proteasome, for the cause clarification, therapy and diagnosis of Alzheimer disease, etc. The new protein is obtained by culturing human lymphoma strain U937 in a culture medium containing 5% bovine fetal serum in a 5% CO₂ gas flow at 37°C, collecting the cells, separating the mRNA by a conventional method, producing a cDNA library by the use of the mRNA, screening the cDNA library with a probe synthesized on the basis of the base sequence of the human 26S proteasome-constituting component protein, joining a gene obtained from the positive clone with a vector, and subsequently expressing the new protein in host cells.

```

ATG GAG GGC TGT GTG TCT AAC CTA ATG GTC TGC AAG CTG GGC TAG AGC      48
Met Glu Gly Cys Val Ser Asn Leu Met Val Cys Asn Leu Ala Tyr Ser
      1           5           10           15
GGG AAG CTG GAA GAG TTG AAG GAG AGT ATT CTG GGC GAT AAA TCC CTC      96
Gly Lys Leu Glu Glu Leu Lys Glu Ser Ile Leu Ala Asp Lys Ser Leu
      20           25           30
      |
      |
      |
CTG GAA GTG GGC AAA GGT GGC CTC GGT TTA ATA CTC AAG ACA ATG GTC      672
Leu Glu Val Ala Lys Gly Gly Leu Gly Leu Ile Leu Lys Arg Met Val
      210           215           220
GAA GGT
Glu Gly
225
  
```

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-75085

(43) 公開日 平成9年(1997)3月25日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
9/64			9/64	
// A 6 1 K 38/00	A A M		A 6 1 K 37/02	A A M

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-235052

(22) 出願日 平成7年(1995)9月13日

(71) 出願人 000173762

財団法人相模中央化学研究所
神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号

(72) 発明者 加藤 誠志

神奈川県相模原市南台1-9-2

(72) 発明者 佐伯 美帆呂

神奈川県茅ヶ崎市松風台17-20

(72) 発明者 関根 伸吾

神奈川県相模原市西大沼4-4-1

(72) 発明者 田中 啓二

徳島県徳島市下町本丁206

(54) 【発明の名称】 ヒト26Sプロテアソーム構成成分蛋白質およびそれをコードするDNA

(57) 【要約】

【課題】 細胞内蛋白質分解系で重要な役割を有しており、各種疾患の治療や診断に用いることが可能なヒト26Sプロテアソーム構成成分およびそれをコードするヒトcDNAを提供する。

【解決手段】 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質および該蛋白質をコードするDNA、例えば配列番号1で表される塩基配列を含むcDNA。

【効果】 本発明のヒトプロテアソーム構成成分P28蛋白質をコードするヒトcDNAの組換え体を発現させることにより該蛋白質が得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項2】 請求項1記載の蛋白質をコードするDNA。

【請求項3】 配列番号1で表される塩基配列を含むcDNA。

【請求項4】 配列番号2で表される塩基配列からなる、請求項3記載のcDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト細胞内プロテアーゼである26Sプロテアソームを構成する蛋白質、およびそれをコードしているDNAに関する。本発明の蛋白質は、ヒト26Sプロテアソームの機能解明に有用であるのみならず、各種病態の診断および治療にも有用である。本発明のヒトcDNAは、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として用いることが出来る。また、該cDNAがコードしている蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることが出来る。

【0002】

【従来技術】多機能プロテアーゼであるプロテアソームは酵母からヒトに至る真核生物に広く存在し、細胞内でエネルギー依存的にユビキチン化蛋白質を分解する酵素である。プロテアソームは分子量21~31kDaの種々の構成成分からなる20Sプロテアソーム、および30~112kDa、沈降係数22SのPA700制御蛋白質群で構成され、全体として沈降係数26S、分子量約200万Daを有する巨大分子（以降、26Sプロテアソームと呼ぶ）より構成されている[Rechsteiner, M. et al., J. Biol. Chem. 268:6065-6068 (1993)、Yoshimura, T. et al., J. Struct. Biol. 111:200-211 (1993)、Tanaka, K. et al., New Biologist 4:173-187 (1992)]。プロテアソームの全容は明かになっていないが、酵母やマウスなどを用いた研究から以下に示すような機能・有用性が明かになっている。

【0003】真核生物の細胞内において、エネルギー(ATP)依存的な蛋白質の分解は、ユビキチンが蛋白質に選択的に結合することにより開始されるが、ユビキチンの結合した蛋白質を分解するATP依存的な活性はプロテアソーム、特に26Sプロテアソームにあることが明かになっており[Chen-Ping, M. et al., J. Biol. Chem. 269:3539-3547 (1994)]、ヒト26Sプロテアソームはエネルギー依存性の蛋白質分解機構の解明に有用であると考えられる。

【0004】c-Myc、Mos、Fosを始めとする

ガン遺伝子やサイクリンのような細胞周期関連遺伝子の分解は、エネルギーおよびユビキチン依存的に26Sプロテアソームにより行なわれることが判明しており[Ishida, N. et al., FEBS Lett. 324:345-348 (1993)、Hershko, A. and Ciechanover, A., Annu. Rev. Biochem. 61:761-807 (1992)]、細胞周期制御におけるプロテアソームの重要性が認識されている。

10 【0005】また肝癌細胞、腎癌細胞、白血病細胞などにおいてプロテアソーム遺伝子は異常発現しており[Kanayama, H. et al., Cancer Res. 51:6677-6685 (1991)]、腫瘍細胞核にプロテアソームが異常に蓄積されていることが観察されている。従って、ヒトプロテアソームはこれらの癌化のメカニズムの解明や癌の診断あるいは治療に有用と考えられる。

【0006】また、プロテアソームの発現がインターフェロン γ などによって誘導され、細胞内でのクラスI主要組織適合抗原提示などに深く関与していることが示唆されている[Aki, M. et al., J. Biochem. 115:257-269 (1994)、Michalek, M. T. et al., Nature 363:552-554 (1994)]。従って、ヒトプロテアソームの構成成分は免疫系の抗原提示のメカニズムの解明や免疫抑制剤の開発にも利用できる。

【0007】さらにアルツハイマー患者の脳内においてユビキチン化蛋白質が異常に蓄積しているという現象[Kitaguchi, N. et al., Nature 331:530-532 (1988)]から、アルツハイマー病にプロテアソームが関与していることも示唆されており、ヒトプロテアソームはアルツハイマー病の原因解明やその治療に有用と考えられる。

【0008】ヒト26Sプロテアソームの特性を有する蛋白質については特開平5-292964に開示されており、またラットプロテアソーム構成蛋白質については特開平5-268957および特開平5-317059に開示されているが、本発明のヒト26Sプロテアソーム構成成分は知られていない。

40 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ヒト26Sプロテアソームを構成する分子量約28kDaの蛋白質（以下P28蛋白質と呼ぶ）、および該蛋白質をコードするDNAを提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の結果、ヒト26Sプロテアソームを構成するP28蛋白質をコードするヒトcDNAをクローン化し、本発明を完成した。すなわち、本発明はヒトP28蛋白質である、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質を

提供する。また本発明は上記蛋白質をコードするDNA、例えば配列番号1で表される塩基配列を含むcDNAを提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の蛋白質は、ヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、本発明のアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは本発明のヒトP28蛋白質をコードするDNAを用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができるが、組換えDNA技術で取得する方法が好ましく用いられる。例えば、本発明のcDNAを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現出来る。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換えてやれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、コードしている蛋白質を大量に発現させることができる。

【0012】本発明のDNAには、上記蛋白質をコードするすべてのDNAが含まれる。該DNAは、化学合成による方法、cDNAクローニングによる方法などを用いて取得することができる。

【0013】本発明のcDNAは、例えばヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローン化することが出来る。cDNAはヒト細胞から抽出したポリ(A)⁺RNAを鋳型として合成する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。実施例ではヒトリンホーマ細胞株U937から単離したポリ(A)⁺RNAを用いた。cDNAは、岡山-Berg法[Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2:161-170 (1982)], Gubler-Hoffman法[Gubler, U. and Hoffman, J. Gene 25:263-269 (1983)]などいかなる方法を用いて合成してもよいが、完全長クローンを効率的に得るためには、実施例にあげたようなベクタープライマーを用いる方法が望ましい。

【0014】cDNAのクローニングは、ウシ26Sプロテアソーム構成成分P28蛋白質の単離精製および部分アミノ酸配列決定、cDNAライブラリーから任意に選択したcDNAクローンの部分塩基配列決定、塩基配列から予測されるアミノ酸配列のデータベース作製、ウシP28蛋白質の部分アミノ酸配列によるデータベース検索によって行なう。cDNAの同定は、シーケンシングによる全塩基配列の決定、塩基配列から予測されるアミノ酸配列とウシP28蛋白質部分アミノ酸配列の比較、インビトロ翻訳による蛋白質発現、大腸菌による発現によって行なう。

【0015】本発明のcDNAは、配列番号1で表される塩基配列を含むことを特徴とするものであり、例えば、配列番号2で表されるものは、1468bpからな

る塩基配列を有し、681bpのオープンリーディングフレームを有していた。このオープンリーディングフレームは、226アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしている。

【0016】なお、配列番号1あるいは配列番号2に記載のcDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、本発明で用いた細胞株から作製したヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のcDNAと同一のクローンを容易に得ることが出来る。

【0017】一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号1あるいは配列番号2において、1又は複数のヌクレオチドの付加、欠失および/又は他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAも本発明の範疇にはいる。

【0018】同様に、これらの変更によって生じる、1又は複数のアミノ酸の付加、欠失および/又は他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の活性を有する限り、本発明の範疇に入る。

【0019】本発明のcDNAには、配列番号1あるいは2で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含むcDNA断片(10bp以上)も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなるDNA断片もこの範疇にはいる。これらのDNA断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

【0020】

【実施例】次に実施例により発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献["Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989]に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。cDNA合成は文献[Kato, S. et al., Gene 150:243-250 (1994)]に従った。

【0021】ウシ26Sプロテアソーム構成成分P28蛋白質の単離精製および部分アミノ酸配列の決定
文献[Chen-Ping, M. et al., J. Biol. Chem., 269:3539-3547 (1994)]に記載されているウシプロテアソームの精製法に従い、ウシ赤血球より、硫酸沈殿、セファクリルS-300、DEAEフラクトゲルおよびハイドロキシアパタイトを用いたカラムクロマトグラフィーによりウシプロテアソームの精製を行なった。得られたウシプロテアソームから、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、P28蛋白質を分画した。該溶出画分を、

ジチオスレイトール還元下、10% SDS-PAGEを行ない、ウシP28蛋白質を単離精製した。

【0022】ウシP28蛋白質の部分アミノ酸配列を以下の方法により決定した。SDS-PAGEで分離したウシP28蛋白質を、0.1Mトリス緩衝液(pH9.0)、4M尿素中、1μgのリジン特異的エンドプロテアーゼにより37℃で8時間酵素消化を行なった。得られた部分ペプチド断片を逆相HPLCで分離し、4種類のペプチド断片についてN末端のアミノ酸配列を自動プロテインシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社)により決定した。各ペプチド断片のN末端アミノ酸配列を配列番号3~6に示した。

【0023】ポリ(A) RNAの調製

ヒトリンフォーマ細胞株U937(ATCC CRL 1593)を5%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地中で5%CO₂気流下37℃で培養した後、フォルボルミリスレートアセテート(30ng/ml培地)で16時間処理し、1.1gの細胞を得た。これを5.5Mグアニジウムチオシアネート溶液16mlに溶解した後、文献[Okayama et al., "Methods in Enzymology" Vol. 164, Academic Press, 1987]に従いmRNAを調製した。これを20mM Tris-HCl(pH7.6)、0.5M NaCl、1mMEDTAで洗浄したオリゴdTセルロースカラムにかけ、上掲文献に従いポリ(A) RNAを精製した。このようにして72μgのポリ(A) RNAを得た。

【0024】cDNAライブラリーの作製

クローニングベクターpKA1(特開平4-117292号公報)をKpnIで消化後、末端転移酵素により約60個のdTテールを付加した。これをEcoRV消化して片側のdTテールを除去したものをベクタープライマーとして用いた。cDNA合成の反応条件は文献[Okayama et al., 上掲文献]に従った。先に調製したポリ(A) RNA 6μgを、ベクタープライマー2.2μgとアニールさせた後、144単位の逆転写酵素(生化学工業社製)を加え37℃1時間反応し、第一鎖cDNAを合成した。反応液をフェノール抽出、エタノール沈殿後、2.5μMdCTP存在下15単位の末端転移酵素を加えて37℃30分間反応しdTCTテール付加を行なった。反応液をフェノール抽出、エタノール沈殿後、50単位のBstXI(ニューイングランドバイオラボラトリー社製)で55℃2時間消化した。反応液をフェノール抽出、エタノール沈殿後、アニールし、300単位の大腸菌DNAリガーゼを添加後12℃一晚 *

表1 アミノ酸配列の比較

配列番号 (N末端からの位置)	アミノ酸配列 (一文字表記)
--------------------	-------------------

*セルフライゲーション反応を行なった。反応液にdNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、300単位の大腸菌DNAリガーゼ、20単位の大腸菌DNAポリメラーゼ、15単位の大腸菌RNaseHを添加して、12℃1時間、次いで22℃1時間反応させ、RNA鎖をDNAに置換した。cDNA合成反応液を用いて大腸菌NM522(ファルマシア社)の形質転換を行なった。形質転換はハナハン法[D. Hanahan, J. Mol. Biol. 166:557-580(1983)]に従った。

【0025】ヒトcDNAライブラリーの塩基配列解析
上記cDNAライブラリーの一部を100μg/mlアンピシリン含有2xYT寒天培地上に蒔いて37℃一晚培養した。寒天上に生じた任意のコロニーを拾い100μg/mlアンピシリン含有2xYT培地2mlに接種して37℃2時間培養後、ヘルパーファージMK13KO7を感染させ、さらに37℃一晚培養した。培養液を遠心して、菌体と上清に分け、上清から常法に従い一本鎖ファージDNAを単離した。一本鎖ファージDNAは、蛍光色素で標識したM13シーケンスプライマーとTaqポリメラーゼ(アプライドバイオシステムズ社製キット)を用いてシーケンス反応を行なった後、蛍光DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社)にかけてcDNAの塩基配列を決定した。反応条件はキットに付属のプロトコールに従った。得られた塩基配列を三フレームのアミノ酸配列に変換し、アミノ酸配列データベースを作製した。

【0026】cDNAクローニング

上記データベースを、ウシP28蛋白質の部分アミノ酸配列で検索した結果、クローンHP10097が含有するプラスミドpHP10097によってコードされている蛋白質が、この部分アミノ酸配列と高い類似性を有していることが判明した。このプラスミドの構造を図1に示す。cDNAインサートの全塩基配列を決定したところ、22bpの5'非翻訳領域、681bpのオープンリーディングフレーム、765bpの3'非翻訳領域からなる構造を有していた(配列番号2)。オープンリーディングフレームは226アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、表1に示すように該蛋白質には配列番号3~6に示した精製ウシP28蛋白質の4個の部分アミノ酸配列と類似性の高いアミノ酸配列がすべて含まれていた。

【0027】

【表1】

```

7
1 (117-135)  NRHEIAVMLLEGGANPDAK
                *****
3              NRHEIAVMLLEGGANPDAK
1 (70-80)     DDAGWSPLHIA
                ****
4              XDAGWQPLHIA
1 (136-144)   DHYEATAMH
                *****
5              XHYEATAVH
1 (190-204)   LLVSQGASIYIENKEE
                *****
6              XLVSQGASIYIENXEL

```

* : アミノ酸が一致している箇所

【0028】なお得られたcDNAの配列を用いて塩基配列データベースGenBank/EMBL/DDBJを検索した結果、ESTデータベースの中に配列番号2で表される本発明のcDNAと部分的に一致するcDNAの部分配列(登録番号R13947など)が登録されていることがわかった。ただし、部分配列が一致するからといって、この断片と本発明の完全長cDNAが同じmRNAに由来するという保証はない。またこの配列からだけでは、コードしているかもしれない蛋白質のアミノ酸配列並びに機能はわからない。

【0029】インビトロ翻訳による蛋白質合成
本発明のcDNAを有するプラスミドpHP10097を用いて、T₇ウサギ網状赤血球溶解物キット(プロメガ社製)によるインビトロ翻訳を行なった。この際[³⁵S]メチオニンを添加し、発現産物をラジオアイソトープでラベルした。いずれの反応もキットに付属のプロトコールに従って行なった。発現産物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、オートラジオグラフィを行ない、翻訳産物の分子量を求めた。その結果、本発明のcDNAは、分子量約26kDaの翻訳産物を生成した。この値は、配列番号2で表される塩基配列から予想される蛋白質の予想分子量24,427と実験誤差内で一致し、このcDNAが確かに配列番号2で表される蛋白質をコードしていることが示された。

【0030】大腸菌による発現
プラスミドpHP10097 1μgを、20単位のPvuIIと20単位のHindIIIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約700bpのDNA断片をゲルから切り出した。ついで、tacプロモーター、メタピロカテカーゼのSD配列、rrnBT1T2ターミネーターを有する大腸菌用発現ベクターpMK12(特開平2-182186号公報)1μgを20単位のPvuIIと20単位のHindIIIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約3kbpのDNA断片をゲルから切り出した。両者のDNA断片をライゲーションキットにより連結後、大腸菌

* JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMKP28-PvuIIを調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

【0031】2本のオリゴヌクレオチドプライマーPR1(5'-GGGACGTCATGGAGGGGTGTGTGTCTAA-3')とPR2(5'-GTCCAGCTGAGCATGCCAGTGCAAT-3')をDNA自動合成機(アプライドバイオシステムズ社)により付属のプロトコールに従い合成した。プラスミドpHP10097を1ngとプライマーPR1、PR2それぞれ100pmoleを用いて、PCRキット(宝酒造社)によりcDNAの5'側翻訳領域を増幅した。フェノール抽出、エタノール沈殿後、20単位のAatII(東洋紡)と20単位のPvuIIで消化し、反応産物を1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、約150bpのDNA断片をゲルから切り出し精製した。

【0032】プラスミドpMKP28-PvuII 1μgを、20単位のAatIIと20単位のPvuIIで消化した後、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、3.7kbpのDNA断片をゲルから切り出した。このDNA断片と先にPCRによって調製した約150bpのDNA断片を、ライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMKP28を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。得られたプラスミドの構造を図2に示す。

【0033】pMKP28/JM109の一晩培養液10mlを100μg/mlアンピシリン含有LB培地100mlに懸濁し、37℃で振とう培養し、A₆₀₀が約0.5になったときにイソプロピルチオガラクトシドを1mMになるように添加した。さらに37℃で3時間培養後、遠心によって集菌した。この溶液を超音波処理後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、26kDaの位置に誘導されてきた蛋白質のバンドが認められた。

【0034】

【発明の効果】本発明はヒト26SプロテアソームP28、該蛋白質をコードするDNA、および該蛋白質をコードするヒトcDNAを提供する。本発明の蛋白質は、プロテアソームの詳細な機能の解明、悪性腫瘍などのプロテアソームの関与する各種病態の診断および治療などに有用である。また、本発明のDNAを用いることにより、該蛋白質を大量に発現することができる。

【0035】

* 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：678

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

*

配列

ATG GAG GGG TGT GTG TCT AAC CTA ATG GTC TGC AAC CTG GCC TAC AGC	48
Met Glu Gly Cys Val Ser Asn Leu Met Val Cys Asn Leu Ala Tyr Ser	
1 5 10 15	
GGG AAG CTG GAA GAG TTG AAG GAG AGT ATT CTG GCC GAT AAA TCC CTG	96
Gly Lys Leu Glu Glu Leu Lys Glu Ser Ile Leu Ala Asp Lys Ser Leu	
20 25 30	
GCT ACT AGA ACT GAC CAG GAC AGC AGA ACT GCA TTG CAC TGG GCA TGC	144
Ala Thr Arg Thr Asp Gln Asp Ser Arg Thr Ala Leu His Trp Ala Cys	
35 40 45	
TCA GCT GGA CAT ACA GAA ATT GTT GAA TTT TTG TTG CAA CTT GGA GTG	192
Ser Ala Gly His Thr Glu Ile Val Glu Phe Leu Leu Gln Leu Gly Val	
50 55 60	
CCA GTG AAT GAT AAA GAC GAT GCA GGT TGG TCT CCT CTT CAT ATT GCG	240
Pro Val Asn Asp Lys Asp Asp Ala Gly Trp Ser Pro Leu His Ile Ala	
65 70 75 80	
GCT TCT GCT GGC CGG GAT GAG ATT GTA AAA GCC CTT CTG GGA AAA GGT	288
Ala Ser Ala Gly Arg Asp Glu Ile Val Lys Ala Leu Leu Gly Lys Gly	
85 90 95	
GCT CAA GTG AAT GCT GTC AAT CAA AAT GGC TGT ACT CCC TTA CAT TAT	336
Ala Gln Val Asn Ala Val Asn Gln Asn Gly Cys Thr Pro Leu His Tyr	
100 105 110	
GCA GCT TCG AAA AAC AGG CAT GAG ATC GCT GTC ATG TTA CTG GAA GGC	384
Ala Ala Ser Lys Asn Arg His Glu Ile Ala Val Met Leu Leu Glu Gly	
115 120 125	
GGG GCT AAT CCA GAT GCT AAG GAC CAT TAT GAG GCT ACA GCA ATG CAC	432
Gly Ala Asn Pro Asp Ala Lys Asp His Tyr Glu Ala Thr Ala Met His	
130 135 140	
CGG GCA GCA GCC AAG GGT AAC TTG AAG ATG ATT CAT ATC CTT CTG TAC	480
Arg Ala Ala Ala Lys Gly Asn Leu Lys Met Ile His Ile Leu Leu Tyr	
145 150 155 160	
TAC AAA GCA TCC ACA AAC ATC CAA GAC ACT GAG GGT AAC ACT CCT CTA	528
Tyr Lys Ala Ser Thr Asn Ile Gln Asp Thr Glu Gly Asn Thr Pro Leu	
165 170 175	
CAC TTA GCC TGT GAT GAG GAG AGA GTG GAA GAA GCA AAA CTG CTG GTG	576
His Leu Ala Cys Asp Glu Glu Arg Val Glu Glu Ala Lys Leu Leu Val	
180 185 190	
TCC CAA GGA GCA AGT ATT TAC ATT GAG AAT AAA GAA GAA AAG ACA CCC	624
Ser Gln Gly Ala Ser Ile Tyr Ile Glu Asn Lys Glu Glu Lys Thr Pro	
195 200 205	
CTG CAA GTG GCC AAA GGT GGC CTG GGT TTA ATA CTC AAG AGA ATG GTG	672
Leu Gln Val Ala Lys Gly Gly Leu Gly Leu Ile Leu Lys Arg Met Val	

11

12

210

215

220

GAA GGT

678

Glu Gly

225

【0036】配列番号：2

配列の長さ：1468

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

* 細胞の種類：リンホーマ

セルライン：U937

クローン名：HP10097

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

10 存在位置：23..703

特徴を決定した方法：E

*

配列

AAGTAGTTGC TGGGACAGCG AA ATG GAG GGG TGT GTG TCT AAC CTA ATG GTC 52
 Met Glu Gly Cys Val Ser Asn Leu Met Val
 1 5 10
 TGC AAC CTG GCC TAC AGC GGG AAG CTG GAA GAG TTG AAG GAG AGT ATT 100
 Cys Asn Leu Ala Tyr Ser Gly Lys Leu Glu Glu Leu Lys Glu Ser Ile
 15 20 25
 CTG GCC GAT AAA TCC CTG GCT ACT AGA ACT GAC CAG GAC AGC AGA ACT 148
 Leu Ala Asp Lys Ser Leu Ala Thr Arg Thr Asp Gln Asp Ser Arg Thr
 30 35 40
 GCA TTG CAC TGG GCA TGC TCA GCT GGA CAT ACA GAA ATT GTT GAA TTT 196
 Ala Leu His Trp Ala Cys Ser Ala Gly His Thr Glu Ile Val Glu Phe
 45 50 55
 TTG TTG CAA CTT GGA GTG CCA GTG AAT GAT AAA GAC GAT GCA GGT TGG 244
 Leu Leu Gln Leu Gly Val Pro Val Asn Asp Lys Asp Asp Ala Gly Trp
 60 65 70
 TCT CCT CTT CAT ATT GCG GCT TCT GCT GGC CGG GAT GAG ATT GTA AAA 292
 Ser Pro Leu His Ile Ala Ala Ser Ala Gly Arg Asp Glu Ile Val Lys
 75 80 85 90
 GCC CTT CTG GGA AAA GGT GCT CAA GTG AAT GCT GTC AAT CAA AAT GGC 340
 Ala Leu Leu Gly Lys Gly Ala Gln Val Asn Ala Val Asn Gln Asn Gly
 95 100 105
 TGT ACT CCC TTA CAT TAT GCA GCT TCG AAA AAC AGG CAT GAG ATC GCT 388
 Cys Thr Pro Leu His Tyr Ala Ala Ser Lys Asn Arg His Glu Ile Ala
 110 115 120
 GTC ATG TTA CTG GAA GGC GGG GCT AAT CCA GAT GCT AAG GAC CAT TAT 436
 Val Met Leu Leu Glu Gly Gly Ala Asn Pro Asp Ala Lys Asp His Tyr
 125 130 135
 GAG GCT ACA GCA ATG CAC CGG GCA GCA GCC AAG GGT AAC TTG AAG ATG 484
 Glu Ala Thr Ala Met His Arg Ala Ala Ala Lys Gly Asn Leu Lys Met
 140 145 150
 ATT CAT ATC CTT CTG TAC TAC AAA GCA TCC ACA AAC ATC CAA GAC ACT 532
 Ile His Ile Leu Leu Tyr Tyr Lys Ala Ser Thr Asn Ile Gln Asp Thr
 155 160 165 170
 GAG GGT AAC ACT CCT CTA CAC TTA GCC TGT GAT GAG GAG AGA GTG GAA 580
 Glu Gly Asn Thr Pro Leu His Leu Ala Cys Asp Glu Glu Arg Val Glu
 175 180 185
 GAA GCA AAA CTG CTG GTG TCC CAA GGA GCA AGT ATT TAC ATT GAG AAT 628

13 14

Glu Ala Lys Leu Leu Val Ser Gln Gly Ala Ser Ile Tyr Ile Glu Asn

190 195 200

AAA GAA GAA AAG ACA CCC CTG CAA GTG GCC AAA GGT GGC CTG GGT TTA 676

Lys Glu Glu Lys Thr Pro Leu Gln Val Ala Lys Gly Gly Leu Gly Leu

205 210 215

ATA CTC AAG AGA ATG GTG GAA GGT TAAACAGCTT GGATTATTC 720

Ile Leu Lys Arg Met Val Glu Gly

220 225

TTACTTTGTA TGTGTGTTG TTGTCCCCAG TGTCTACAA ACTAATGTAT TTGTGCACAA 780

GACATCATCT ATGAATGATG AAGTTTCTC ACCTTCAAAG TCTTATAAAC ATGTTGACTC 840

TTGTTCTGCTG TGAGTTACTT GTTCGAAGCT TACAGCTTGT TTTCCAGGCA TCGAATAACT 900

GTTGAGATTG TTCTACTGTT GTCGTATATT CTTCTATATT GAATTCTGGT TAATTGGAG 960

TAACTAATTC TGTGGCTGTT GTGAGTCTTC AGCACCCTCC CATGTACCTT ATATCCCTCT 1020

CTGAAACAGA ACAGCTCCAA TAGCAACAAG CTAGTTGTTT TCCAGATGT TTCTATGTGG 1080

ATTCTGTAAT GTTCTCCAT ACAGTTAAAA CATCCTAACT TGTTTTTCAG GCTCACTCAG 1140

GCCTACGCCA AACGTTTCTG TTTTTTTTAA CCATGAGGTT TAATTTATTT TTGTGATAGG 1200

AGGGATATTT ACATATTTTA GTGGACCACA TTTTAAGTTG GATGGTGTGC TCTAAAATAC 1260

TGAAAAACAA TAGCCCATAT ACCTATGTAT TTGTTTTTGA TGGGTGTTT ACTCTGAAAT 1320

AAAATGTATG GTTTTCTTAA AAGGAAGTTT TAAAGTACCT ATTTTGTGTC ATCCTGTATT 1380

GAAAAGAATG TCAAGCTTGT TAAATGACA TGTAACAAAA ATGTATTTTG ATTTGTATTT 1440

CAGAACTAA AAAATAAAAT GTTGAAG 1468

【0037】配列番号：3

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

* フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：ウシ

細胞の種類：赤血球

*

配列

Asn Arg His Glu Ile Ala Val Met Leu Leu Glu Gly Gly Ala Asn Pro

1

5

10

15

Asp Ala Lys

【0038】配列番号：4

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：ウシ

細胞の種類：赤血球

配列

Xaa Asp Ala Gly Trp Gln Pro Leu His Ile Ala

1

5

10

【0039】配列番号：5

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

※

配列

Xaa Leu Val Ser Gln Gly Ala Ser Ile Tyr Ile Glu Asn Xaa Glu Leu

※起源：

生物名：ウシ

細胞の種類：赤血球

配列

Xaa His Tyr Glu Ala Thr Ala Val His

1

5

【0040】配列番号：6

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

40 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：ウシ

細胞の種類：赤血球

15

1

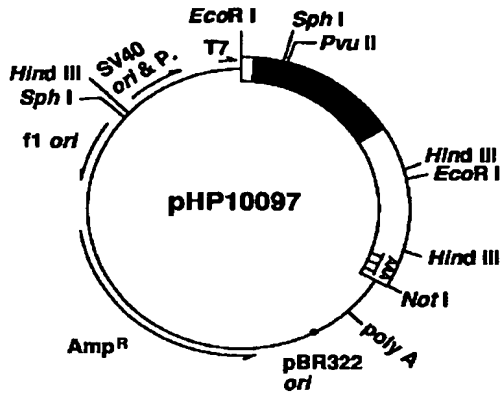
5

【図面の簡単な説明】

【図 1】 クローンHP10097の構造を表す図である。

*

【図 1】



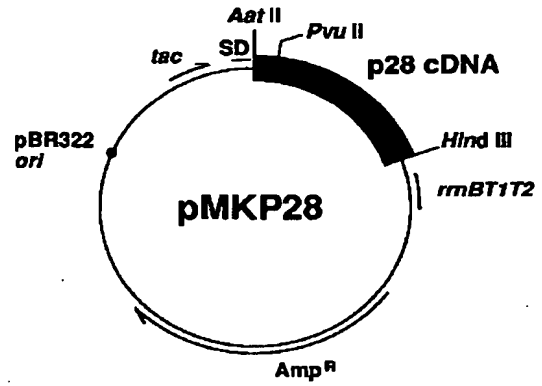
16

10

15

* 【図 2】 大腸菌用発現ベクター pMKP28の構造を示す図である。

【図 2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ADU		A 6 1 K 37/02	ADU
(C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 9/64				
C 1 2 R 1:19)				